INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Supplemento das Memorias

Nº. 11 25 de Outubro de 1929

Summario:

Costa Lima, Dr. A. da. Considerações sobre a musculatura dos segmentos terminaes da perna de alguns insectos e sobre a funcção do chamado ORGÃO TARSAL..... 257

Martins, Dr. Thales. O cyclo estral dos ratos em parabiose, e os hormonios do lobo anterior da hypophyse..... 265

Contents:

Martins, M. D., Thales. The estrous cycle of the albino rat in parabiosis, and the hormons of the anterior hypophysis..... 270

LONDON SCHOOL OF HYGIENE & TROPICAL MEDICINE

O supplemento das Memorias destina-se á publicação immediata das pesquizas realizadas no Instituto Oswaldo Cruz.

RIO DE JANEIRO

Typ. do INSTITUTO OSWALDO CRUZ

1929

27 NOV 1929
TROPICAL DISEASES

Considerações sobre a musculatura dos segmentos terminaes da perna de alguns insectos e sobre a funcção do chamado ORGÃO TARSAL. (1)

Pelo Dr. A. da COSTA LIMA.

No fasciculo 8 do *Boletim Biologico*, de 18 de Agosto de 1927, ha um artigo do Prof. CEZAR PINTO sobre a presença de um estigma respiratorio no articulo apical do tarso de alguns insectos por elle examinados.

Quando li o referido artigo, pouco tempo depois de publicado, escrevi uma carta a esse distincto collega dizendo-lhe que certamente houvera algum equivoco em sua observação, por não ser possivel a presença de um orgão respiratorio dessa natureza nas pernas dos insectos.

Mais tarde, quando aqui nos encontrámos, fiz-lhe vêr a conveniencia de revêr o seu trabalho, estudando novamente o orgão que havia considerado um estigma e que devia ter uma funcção especial, talvez mesmo ainda não assignalada pelos autores.

CEZAR PINTO, occupado então com trabalhos mais interessantes, adiou para mais tarde a execução de pesquizas nesse sentido, que, estou certo, lhe forneceriam dados seguros para melhor ajuizar a funcção do orgão em questão.

Ha pouco tempo elle recebeu do Prof. S. de TOLEDO PIZA JUNIOR um exemplar do ultimo numero da *Revista de Agricultura*, contendo um artigo desse Professor, intitulado: "Sobre um dispositivo pouco conhecido para a movimentação das garras de *Haematopinus suis* L".

Nesse artigo TOLEDO PIZA assignala o equivoco observado no trabalho de CEZAR PINTO, aliás evidente nas figuras apresentadas pelo autor, mostrando que o orgão tarsal por elle observado não é um estigma, como tambem não é trachéa o filamento com que se relaciona e, finalmente, apresenta uma interpretação respeito á funcção desse orgão.

Não podendo CEZAR PINTO, no momento, retomar a questão, por estar revendo as provas do seu livro sobre Parasitologia Medica, pedio-me que a examinasse, publicando os resultados a que chegasse.

A par das pesquizas que tive de realisar, procurei ler a bibliographia sobre o assumpto. Dentre os varios trabalhos que pude consultar sobre a anatomia da perna dos insectos, devo citar, como mais desenvolvidos na parte relativa ao orgão tarsal, os de DAHL e de OCKLER.

No trabalho de LAURA FLORENCE sobre o *Haematopinus suis* (L.), no de STRÖBELT sobre o *Linognathus vituli* (L.) (= *Pediculis tenuirostris* BURM.), embora se encontrem boas descripções da musculatura das pernas desses piolhos, ha apenas ligeiras referencias ao alludido orgão. Em

(1) Apresentado a Academia Brasileira de Sciencias, em sessão de 10 de Setembro de 1929.

outros trabalhos, cuja relação se encontra na parte bibliographica desta nota, ou elle é apenas assignalado nas descripções ou figuras apresentadas, ou os autores, descrevendo o funccionamento do mesmo, fazem-no seguindo uma opinião anterior. Comtudo, todos os pesquizadores são acórdes em consideral-o como uma estructura elastica destinada a distensão da garra. D'ahi o nome pelo qual é conhecido desde 1884, quando DAHL o designou *Streckplatte* ou *stipes extensor unguim.*

TOLEDO PIZA, baseando-se nas pesquizas de LAURA FLORENCE sobre os musculos e respectivos tendões da perna de *H. suis* e nas que poude executar, considera-o com funcção diversa, isto é, analogo a uma mola, que mantem a garra contrahida quando o musculo tibial se acha em repouso. A distensão da garra seria, pois, activa e obtida, como procurou demonstrar FLORENCE, pela contracção do musculo tibial (*extensor muscle* de FLORENCE) sobre o dispositivo tarsal.

A funcção e mecanismo por elle expostos poderiam ser admissiveis, caso a descripção e figuras que apresentou das pernas de *H. suis* representassem exactamente o que de facto se encontra na extremidade desses appendices locomotores. Entretanto aquellas indicam que TOLEDO PIZA fez um exame incompleto da região, pelo qual não lhe foi possivel chegar a resultados inteiramente de accordo com a disposição real das estructuras observadas.

Acho que TOLEDO PIZA deveria ter proseguido nos seus estudos, sem entretanto abandonar, como fez, por considerar impracticaveis, os processos de techica usuaes nas pesquizas anatomicas. Ao meu ver o methodo que adoptou em suas pesquizas deve alterer consideravelmente as estructuras mais delicadas que se encontram dentro das pernas de um insecto, pois elle trata o material, depois de fixado, lavado e deshydratado, pela essencia de cedro, aquecida á ebulição e até que a mesma adquira um tom vermelho queimado.

SOBRE A MUSCULATURA DAS PERNAS DOS PIOLHOS

Em minhas pesquizas examinei pernas de *Haematopinus suis* (L.) e de *H. eurysternus* (NITZSCH). Para exames comparativos observei tambem os musculos das pernas de formas jovens de *Empicoris peregrinator* (L.), de *Cimex hemipterus* L., de alguns hemipteros (chermideos e aphidideos).

O material foi estudado pelos seguintes processos:

Exame de pernas integras ou dissecadas, montando o material em meio aquoso ou em glycerina.

Exame de pernas integras depois de fixadas, coradas, deshydratadas e devidamente clarificadas, montando-as em balsamo do Canadá.

Secções transversaes do tarso, ao nivel do orgão tarsal, usando material previamente fixado, executando-as com lamina Gillette sob o binocular. Secções longitudinaes, collocando a perna do insecto entre duas laminas, encostando-a a uma lamina espessa previamente colada a uma das laminas e cortando-a, ao longo do eixo longitudinal da perna, por meio de uma Gillette que se faz deslisar entre as 2 laminas até o bordo da laminula.

Finalmente, córtes histologicos, fixando o material pelo ZENKER acetico, tendo o cuidado de tratal-o, depois da lavagem, por um amolecedor da chitina (diaphanol ou segundo a technica do nitrito de sodio aconselhada por DRAHER).

Alem dessas pesquizas, relativas a estructura das regiões que devia examinar, fiz tambem algumas de ordem physiologica, para estudar os movimentos das garras dos piolhos e phenomenos correlatos.

Deti-me um pouco mais no exame da tibia e do tarso da perna de *H. suis*. Pude, assim, tambem observar a disposição das trachéas e acompanhar as principaes ramificações do nervo tibial.

Como, porém, no momento, só interessa a pârte referente a musculatura, analysarei resumidamente, nas linhas que se seguem, o que sobre ella se tem escripto, assignalando o que me parece falho na observação dos autores.

Deixando de lado a musculatura dos primeiros segmentos da perna, em geral bem descripta pelos autores e, no caso especial dos pediculideos, por LANDOIS, STRÖBELT, OCKLER, OSBORN, MÜLLER e FLORENCE, passarei a considerar a musculatura do femur

Encontram-se ahi, como mostraram LANDOIS e STRÖBELT, 3 musculos e não dois, como vio FLORENCE.

1º. *Flexor* ou *adductor da tibia*, constituido por um feixe que atravessa o femur da base ao apice, parallelamente ao longo eixo, com o qual se relacionam cerca de 6 feixes musculares, que se inserem, em intervallos approximadamente iguaes, de cada lado, na parte dorsal do femur, desde um pouco alem do meio do femur até a curvatura basal. Todos esses feixes se dirigem para baixo, para diante, e, reunidos ao feixe longitudinal inferior, se fixam por meio de um tendão na parte ventral da articulação femur-tibial no apodema tibial que ahi se encontra.

2º. *Extensor* ou *abductor da tibia*, constituido por feixes musculares que percorrem longitudinalmente a parte dorsal, inserindo-se, de um lado na articulação do femur com o trochanter e na parede dorsal e proximal do femur e do outro, por meio de um tendão, na parte superior da articulação femur-tibial.

3º. Entre os 2 musculos citados, ao longo do meio do femur, ha um outro constituido por 2 feixes relativamente finos, de inserção basal, que terminam, um pouco antes da articulação femur-tibial, n'um tendão relativamente espesso. Este se dirige para a parte ventral da articulação femur-tibial, onde se relaciona com os grossos troncos trachéaes e com o tronco nervoso que por ahi passam e, encostando-se depois ao apodema basal da tibia, vae se unir ao flexor da garra.

A presença deste musculo na perna do *Haematopinus* nada tem de extraordinario, pois elle representa o *feixe proximal* ou *femural* do *longo flexor de garra*, perfeitamente distincto do *feixe distal* ou *tibial*, ambos observados em quasi todos os insectos. Tive o ensejo de aprecial-os mais nitidamente nas pernas dos 2 hemipteros citados e de alguns dos homopteros que tambem examinei nas minhas pesquizas. Nestes insectos vê-se nitidamente o tendão do longo flexor originar-se no femur, percorrer toda a tibia e tarso sob a forma de um longo filamento, que se relaciona com o orgão tarsal, dando inserção, ao passar pela tibia, aos feixes distaes.

Nas photomicrographias ns. 1 a 2 vê-se nitidamente o referido tendão.

A musculatura da tibia, é constituida por varios musculos que devem tambem desempenhar funcções differentes.

Na parede dorsal da tibia inserem-se, de cada lado, em intervallos muito approximados e aquem do meio para a articulação femur-tibial, 4 feixes musculares. Os 3 distaes superiores, que se dirigem obliquamente para a extremidade distal, reunem-se com o proximal, mais expesso e inferiormente situado e com os do lado opposto. Ao longo do eixo longitudinal da tibia, esses feixes encontram 2 outros inferiores que se inserem na paparede ventral (um de cada lado) abaixo do apodema basal da tibia, tambem dirigidos obliquamente para a extremidade distal deste segmento.

O tendão que passa do femur para a tibia, ainda bem chitinisado ao passar pelo apodema tibial, expande-se pouco adiante n'uma membrana que envolve a massa muscular inferior, continuando-se n'um outro envoltorio membranoso, reforçado no centro pelo tendão que vae terminar no orgão tarsal. Este tendão, a principio um simples espessamento desse envoltorio, a proporção que se approxima do orgão tarsal, vae adquirido mais consistencia para se apresentar, na sua porção distal, com o aspecto de uma corda relativamente espessa e roliça que se insere na parte superior do extremo proximal do orgão tarsal. Na sua porção proximal está em relação não sómente com os musculos tibiaes contractores da garra, que devem ser os feixes de inserção ventral, como com o tendão que penetra na tibia, oriundo dos musculos femuraes.

Os feixes que se inserem na parede dorsal da tibia, especialmente os 2 grossos feixes inferiores, da inserção juxta-articular, e que atravessam a tibia, da base ao apice, formando um Y de abertura voltada para a extremidade proximal da tibia, quando se examina o segmento pela parte dorsal, devem ser os extensores da garra.

A presença de um musculo extensor da garra é negada pela maioria dos autores que consideram todos os musculos da tibia como um contractor da garra. Apenas FLORENCE e TOLEDO PIZA classificam a totalidade das massas musculares da tibia como um só musculo extensor.

Não me foi possivel consultar o trabalho de OSBORN sobre o *Haematopinus suis*, de modo que não posso julgar o que elle escreveu — e que me parece certo — a respeito dos musculos tibiaes, senão pela seguinte passagem de FLORENCE:

"OSBORN figured this large muscle (ella se refere indubitavelmente ao musculo tibial) lying in the tibia as inserted in the dorsal wall of the tarsus, and a continuation passing from there to the dorsal curve of the claw. He also figured a flexor muscle of the tarsus".

As pesquizas que fiz autorizam-me, entretanto, a assignalar na tibia dos pediculideos, não sómente um extensor e um flexor da garra, como tambem a existencia de um flexor da tibia. O extensor da garra está em relação, na parte distal (tarsal), com um tendão achatado que passa acima do orgão tarsal para se inserir, após se ter bifurcado, na base da curva dorsal da garra. A base da curva ventral da garra está ligada, por um forte ligamento, a extremidade distal do orgão tarsal e este, pela sua extre-

midade proximal, ao tendão do flexor. A bainha ligamentosa que envolve os musculos tibiaes emitte tambem prolongamento ventraes, sob o tendão do flexor da garra, que se inserem no fundo e no assoalho esclerosado da *cavidade tarsal.*

Quanto ao musculo *flexor do tarso*, precisamente o que FLORENCE chama de "retractor of the disc": trata-se de um fino musculo que, emergindo do meio da massa dos musculos tibiaes, emitte um tendão de 2 cordas justapostas, que se dirige obliquamente ao apice da tibia e se insere no extremo proximal do apodema tarsal e não ha base do disco protractil (1), como imaginou FLORENCE. A impressão que se tem deste pequeno musculo retractor do tarso é de que elle não deve ter uma acção apreciavel e dahi ser praticamente immovel a articulação tibio-tarsica.

SOBRE O ORGÃO TARSAL (STRECKPLATTE).

A estructura do tarso dos insectos foi estudada por varios autores, porem, inbitavelmente os melhores trabalhos de conjuncto são os de DAHL e de OCKLER.

No que respeita a anatomia do tarso dos pediculideos a descripção que me parece mais perfeita é a de OCKLER relativa ao *Phthirus pubis* (L.)

Como já disse foi DAHL quem, pela primeira vez, estudou detalhadamente o orgão tarsal, assignalando as relações que elle mantem com o tendão do flexor da garra e com a propria garra e considerando-o como um orgão destinado a distensão da garra (Streckplatte). Verificou tambem a presença, no apice do tarso, de uma cavidade, que se communica com o exterior por uma abertura ao nivel da base da curvatura ventral da garra e que se prolonga internamente até o meio do tarso. Descreveu ainda a forma e o revestimento fortemente chitinisado do assoalho dessa cavidade, monstrando tambem que o tecto da mesma é principalmente occupado pela face ventral do orgão tarsal, que se pode deslocar livremente na cavidade, dada a elasticidade das ligações que o prendem ao tecto.

OCKLER, confirmando e completando as observações de DAHL, deteve-se não só no estudo da "Streckplatte" como no da gotteira esclerosada da referida cavidade—"Gleitrinne"—aliás já anteriormente estudada por GRABER.

Acredito que se elle tivesse examinado mais cuidadosamente esta ultima estructura, não teria considerado o orgão tarsal, como os autores que o precederam e os que o seguiram, como um dispositivo para a distensão da garra, ou para contracção, na interpretação de TOLEDO PIZA. Bastaria sómente comparar a posição do orgão tarsal em relação com a gotteira tarsal, quando a garra está retrahida ou quando ella se acha distendida (figs. 9 e 10), para comprehender que elle não deve actuar na movimentação da garra.

---

[1] Esta formação, designada por ENDERLEIN sob o nome de "Prätarsalsklerit" não deve ser confundida com o *onychium* [empodium, pulvillus, de outros autores] que se acha num dos lados da extremidade do tarso e que, no *H. suis*, é perfeitamente visivel sob a forma de uma lingueta triangular ponteaguda, apresentando um espinho basal recurvado para a ponta do onychium (v. fig. 4).

Se OCKLER tivesse tambem notado a superficie aspera da "Gleitrinne", eriçada de finissimos dentes negros e sabendo que sobre essa gotteira, com os movimentos de contracção e de extensão da garra, attritava a face ventral estriada da "Streckplatte", certamente concluiria que se tratava de um simples dispositivo estridulatorio. De facto a "Streckplatte" ou simplesmente o *orgão tarsal*, não é senão a *radula* desse apparelho estridulatorio, que funcciona de modo um tanto analogo ao instrumento, creio que de origem africana, a que nós damos o nome de "réco-réco". Cheguei a este resultado após ter examinado pernas recentemente amputadas de piolhos jovens, com as quaes, por transparencia, podia observar ao binocular os movimentos da garra. Notei assim que o orgão tarsal, com a contração da garra (acto indubitavelmente tão activo como o da distensão), retrahe-se completamente na cavidade tarsal, e com a distensão, fica em grande parte exposto (v. fig. 10). Observei tambem que, nos movimentos de vae e vem da garra, a forma do orgão tarsal mantem-se a mesma, nem se distendendo nem se retrahindo. Já suspeitando da sua verdadeira funcção, passei a examinar, com forte augmento, as secções longitudinaes e transversaes do tarso ao nivel da gotteira tarsal e assim pude ver as finissimas pontas negras, ha pouco citadas, que emergem da cuticula da gotteira e que, embora muito delicadas, devem apresentar uma rigidez consideravel, pois se originam profundamente na espessura da parede da cavidade, como se pode ver bem examinando cortes feitos ao nivel das duas placas lateraes, fortemente esclerosadas, que constituem a "Gleitrinne". Aliás, só o facto de se observar esta gotteira bem desenvolvida nos tarsos que tambem apresentam um orgão tarsal bem desenvolvido, deveria ter despertado a attenção dos pesquizadores. Nos hemipteros que estudei observam-se as duas formações, perém ambas muito menos desenvolvidas que nos pediculideos. Assim no pentatomideo *Empicoris peregrinator* (L.) a placa estridulatoria ("Streckplatte"), em vez de ser transversalmente estriada, é simplesmente escamosa, como aliás DAHL e OCKLER já haviam observado em outros insectos, e a gotteira apresenta a superficie aspera porém não denteada. Mesmo nos pediculideos a denticulação é ás vezes imperceptivel, mormente em se tratando de formas jovens.

Faltava-me apenas verificar experimentalmente e producção de ruidos estridulatorios. Depois de ter experimentado sem resultado apreciavel os methodos de JANET e de SANTCHI para a precepção de sons de fraca intensidade produzidos pelas formigas, lembrei-me de usar o seguinte, que, se não é o mais perfeito, tem a vantagem de ser muito simples. Tomo dois tubos de borracha com 10 cm., de comprimento, pouco mais ou menos, por 1 cm., de diametro. Num dos orificios de cada tubo colloco um piolho no meio de alguns fios de algodão, fechando-o depois com um rolha. N'um tubo colloco um piolho perfeito e no outro um especimen com os tarsos amputados na base do orgão tarsal. Os dois tubos são introduzidos pelas extremidades abertas nos conductos auditivos de modo a ficarem suspensos e sem que haja qualquer attrito. Do tubo em que se acha o piolho mutilado ouve-se um ruido muito fraco, quasi imperceptivel, resultante do attrito do corpo do insecto com os fios de algodão. Do outro, porém, além desse ruido, ouve-se nitidamente, de quando em vez, e ás vezes seguidamente, uma crepitação especial que deve ser a estridulação

produzida pelo orgão tarsal. E' indispensavel collocar o piolho numa trama de alguns fios de algodão ou em um pello do animal em que vive, pois, se o deixarmos sobre a rolha ou se o montarmos n'uma agulha, fincando-a no dorso do abdomen e montando-a na rolha, de modo a que as pernas se movam livremente, não se ouvirá ruido algum. Isso porque, se o piolho não tiver um pello para se movimentar, como o faz em condições normaes, isto é, deslocando-se mediante movimentos da garra de encontro a tibia, elle se mantem sempre com a garra distendida, como se pode ver bem observando um piolho deslocar-se sobre uma lamina de vidro.

Pretendo, logo que tenha novo material, melhorar as condições da experiencia usando um microphone especial, typo Hughes, ligado a um ampliador de radio, de modo a tornar bem perceptiveis os ruidos produzidos por especimens perfeitos e mutilados, para a devida comparação, e, se conseguir melhores resultados, communical-os-ei opportunamente.

BIBLIOGRAPHIA

LANDOIS, L. 1864. Untersuchungen über die auf den Menschen schmarotzenden Pediculiden. I. Anatomie der Phthirius inguinalis Leach. Zeitschr. f. wiss. Zool. **14**: 1—26. Taf. I—V.

STRÖBELT, O. 1882. Anatomie u. Physiologie v. Haematopinus tenuirostris. Inaug. Dissert. Münster. Düsseldorf. Traduzido por DALLAS (1883): Ann. Mag. Nat. Hist. **5**: 11:73—108. Pl. III.

DAHL, F. 1844. Beiträge zur Kenntniss des Baues und der Funktionen der Insektenbeine. Arch. f. Nat. **52**: 146 – 193. Taf. XI—XIII.

SIMMERMACHER, G. 1884. Untersuchungen über Haftapparate an Tarsalgliedern von Insekten. Zeitschr. f. wiss. Zool. **40**: 481 – 556. Taf. XXV—XXVII.

GRABER, V. 1885. Über die Mechanik des Insektenkörpers. Biol. Centralbl. **4**: 560—570.

JORDAN, K. 1888. Anatomie und Biologie der Physapoda. Zeitschr. f. wiss. Zool. **47**: 541—620. Taf. XXXVI—XXXVIII.

OCKLER, A. 1890. Das Krallenglied am Insektenfuss. Archiv. f. Naturgesch. **56**: 221—262. Taf. XII—XIII.

OSBORN, H. 1891. The hog louse. No folheto: "The Pediculi and Mallophaga affecting man and the lower animals. U. S. Ent. Div. Bull. **7**: 18—21 (*Não consultado*).

ENDERLEIN, J. 1904. Läusestudien. Über die Morphologie, Klassification, und systematische Stellung der Anopluren nebst Bemerkungen zur Systematik der Insekten-Ordnungen. Zool. Anz. **28**: 121 – 147.

WOODWORTH, C. W. 1908. The leg tendons of insects. Amer. Nat. **42**: 452 – 456.

MJÖBERG, E. 1910. Studien über Mallophagen und Anopluren. Ark. f. Zool. **6**: 1—296. Taf. I—V.

MÜLLER, J. 1915. Zur Naturgeschichte der Kleiderlaus. Oesterr. Sanitätsw. **27** 36—38 1—63.

TULLGREN, A. 1918. Zur Morphologie und Systematik der Hemipteren I. Entom. Tidsk. **39** : 113—133. Fig. I—II.

FLORENCE, L. 1921. The hog louse *Haematopinus suis* LINNE; its biology, anatomy and histology. Cornell Univ. Agric. Exper. Sta. Mem. **51** : 641—725, Pl. LVIII—LXVI.

PINTO, CEZAR. 1927. De la presence d'un stigmate respiratoire sur les tarses du *Cimex hemipterus*, *C. lectularius*, *Pediculus humanus*, *Haematopinus eurysternus* et chez les larves de *Triatoma megista*. Bol. Biol. **8** : 115—128, Fig. 1—12

TOLEDO PIZA JOR, S. de. 1929. Sobre um dispositivo pouco conhecido para a movimentação das garras no *Haematopirus suis* L. Rev. Agricult. **4** : 219--223. Fig. 1—7.

WEBER, H. 1929. Biol. Untersuchungen an der Schweinelaus (*Haematopinuis sus* L.) unter besonderer berüchsichtigung der Sinnesphysiologie. Zeitschr. f. wiss. Biol. Abt. 6. **9** : 564 - 612.

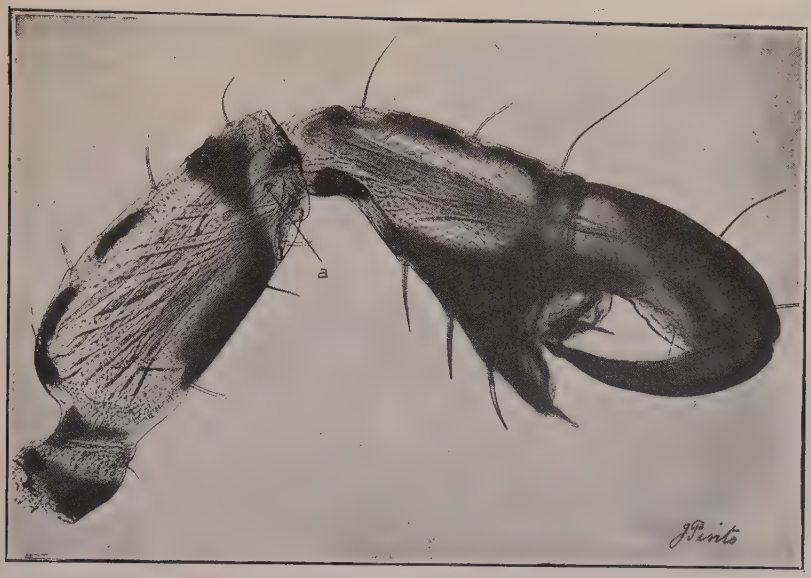

Fig. 1

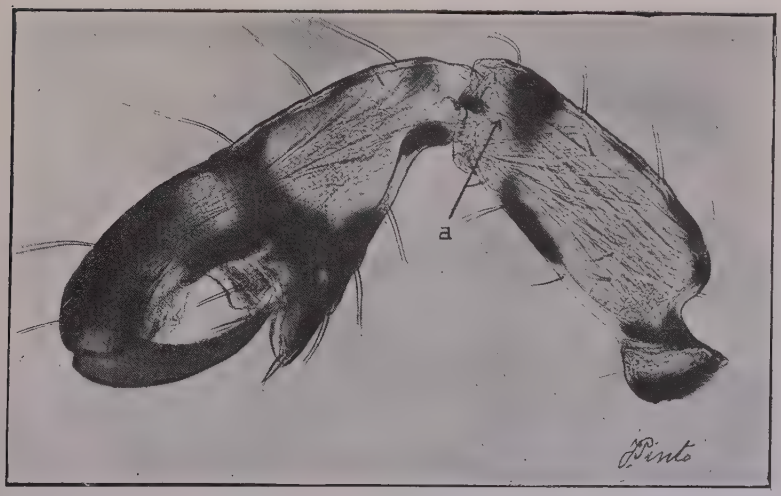

Fig. 2

Figs. 1 e 2—Pernas de *Haematopinus*. Nos pontos marcados vê-se o tendão do feixe femural do flexor da garra (× 80).

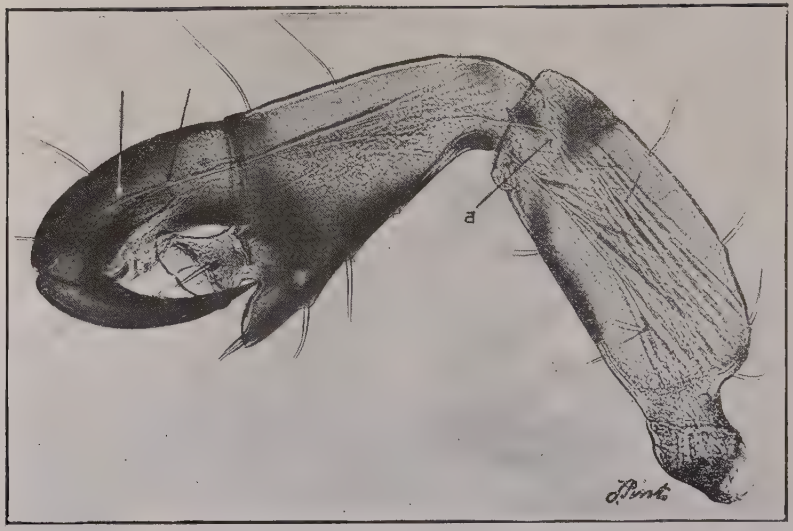

Fig. 3

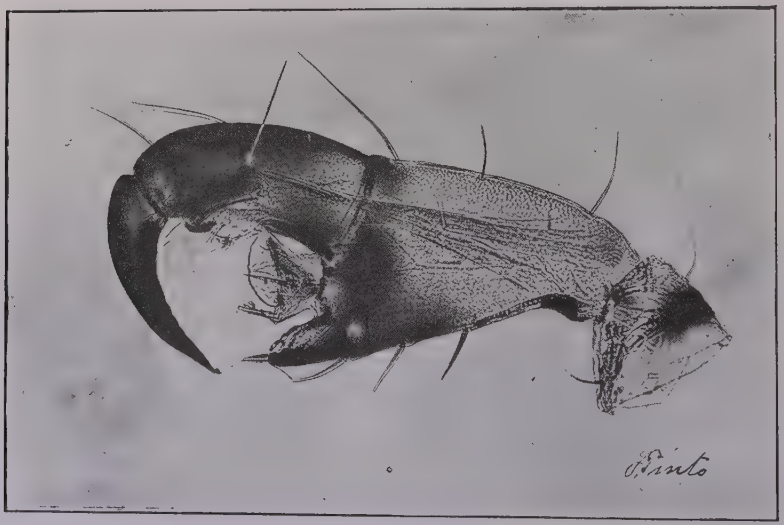

Fig. 4

Figs. 3 e 4—Pernas de *Haematopinus*. Nos pontos marcados no tarso vê-se o tendão do extensor da garra, sobre o orgão tarsal. Na fig. 3, em *a*, o tendão do feixe femural do flexor da garra. (× 80)

Fig. 5

Fig. 6

Figs. 5 e 6—Nestas photomicrographias nota-se, nos pontos marcados, o tendão do flexor do tarso. Na fig. 6 vê-se perfeitamente que elle se insere na base do apodema tarsal e não na base do disco protractil. (× 80 e × 150)

Fig. 7

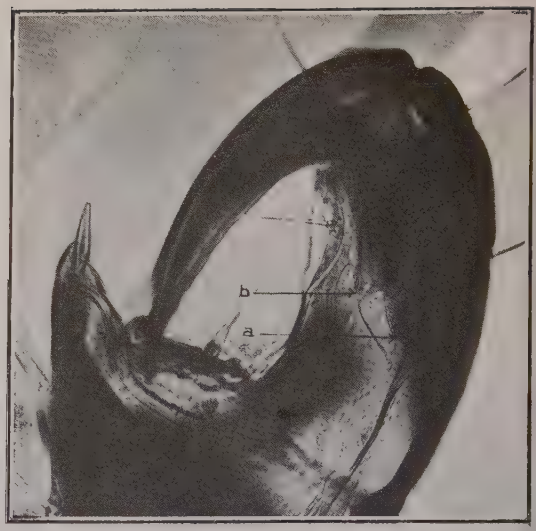

Fig. 9

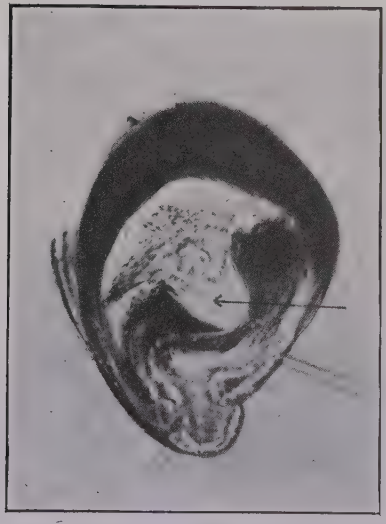

Fig. 8

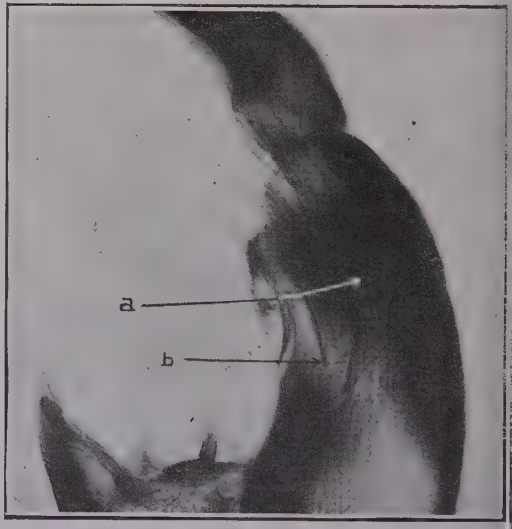

Fig. 10

Fig. 7—Garra de *Haematopinus*, com o orgão tarsal e o tendão do flexor da garra. (× 107)

Fig. 8—Corte feito ao nivel da extremidade do tarso, para se vêr a forma da gotteira tarsal, cujas paredes se mostram bem espassadas. Vêm-se tambem as partes molles do tecto, sem o orgão tarsal. (× 250)

Figs. 9 e 10—Tarsos de *Haematopinus* com a garra contrahida e distendida. Na fig. 9 a extremidade posterior do orgão tarsal (*a*) se acha aquem da extremidade posterior da gotteira (*b*) (× 170). Na fig. 10 aquella extremidade se acha alem desta. (× 163)

(Photomicrographias de J. Pinto).

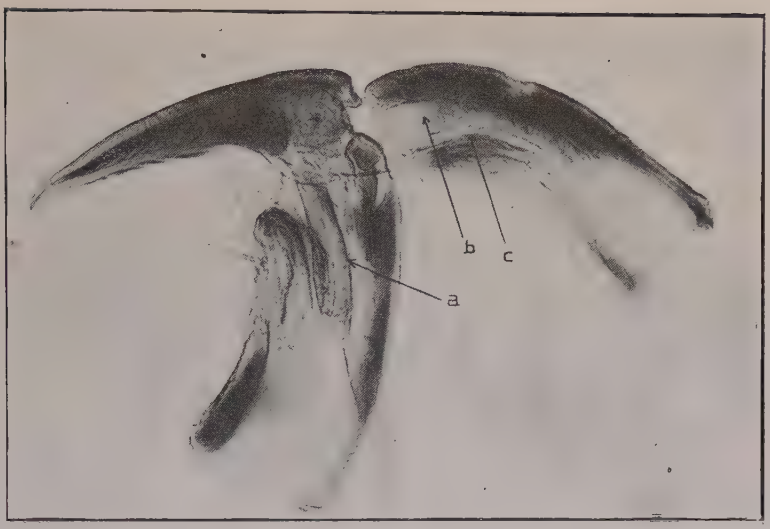

Fig. 11

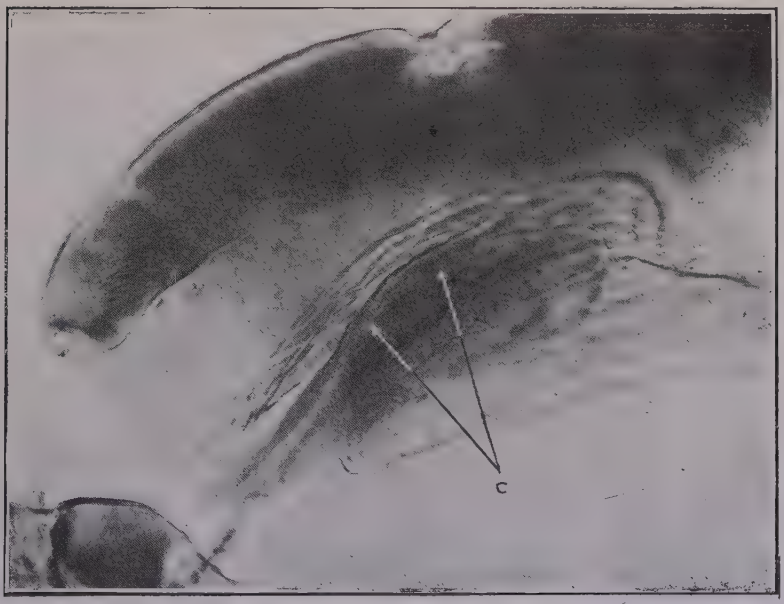

Fig. 12

Fig. 11—Tarso de *Haematopinus* fendido. N'uma das metades vê-se o orgão tarsal (*a*) em relação com uma parte da gotteira tarsal. Na outra metade vê-se apenas a cavidade tarsal (*b*) e a outra parte da gotteira tarsal (*c*) ($\times$108).

Fig. 12—Ampliação da metade tarsal superior da fig. 11, para se ver o aspecto da superficie da gotteira tarsal, eriçada de pequeninos dentes em *c*. ($\times$ 383). (Photomicrographias de J. Pinto).

O cyclo estral dos ratos em parabiose, e os hormonios do lobo anterior da hypophyse

Pelo Dr. THALES MARTINS

Laboratorio de Physiologia, Instituto Oswaldo Cruz

Publicámos no ultimo numero deste supplemento (1) os primeiros resultados por nós observados na parabiose do rato branco, relativamente ao intercambio hormonal.

Foi demonstrada a passagem do hormonio ovariano de uma femea normal para uma castrada; resultado identico foi conseguido quando um dos animaes soffria a ablação do utero. No presente trabalho, continuamos a observação dos animaes, iniciada na nossa nota anterior.

Outros autores que pesquizaram o cyclo sexual dos ratos naquella situação experimental, chegaram a conclusões diversas, antes de nós.

ZACHERL (2), na parabiose de uma femea normal com uma castrada, verificou que 8 a 10 dias após a operação, as variações cyclicas do estro desappareciam, e o frottis vaginal mostrava sempre leucocytos e cellulas epitheliaes. Um estadio de cellulas keratinisadas puras nunca foi encontrado; na parceira castrada, observou a mesma cousa.

FELS (3) verificou que a normal ás vezes se apresenta com estros duradouros, mas a castrada fica permanentemente em intervallo.

Em conclusão: ZACHERL e FELS não verificaram a passagem do hormonio ovariano da rata normal para a castrada.

A causa da diversidade dos resultados dos autores citados e os nossos não resalta claramente, dada a falta de detalhes nas publicações referidas. Insufficiencia de relações vasculares? Possivelmente o estado geral dos animaes teria influencia, uma vez que FELS conseguiu em media, uma sobrevida de 3 semanas após a operação, e um maximo de 38 dias.

Temos animaes muito bem dispostos, com 70 dias de parabiose, e o par R 3 (fig. 1) foi photographado no seu 46º dia.

EXPERIENCIAS

6 ratos brancos femeas da mesma ninhada foram tomados para a experiencia. Quando attingiam um peso de 35—37 grs, 3 foram castrados. 25 dias após, com um peso de 75—80 grs, foram feitas as parabioses, (coelioanastomose), abertas largamente as cavidades abdominaes, fazia-se a sutura em tres planos: peritoneo, musculo e pelle.

Os animaes ficaram assim distribuidos:

Par R 2—Uma hysterectonisada com uma castrada.
Par R 3—Uma normal com uma castrada.
Controles livres—Uma normal e uma castrada.

O frottis vaginal era pesquizado diariamente com a technica usual; quando havia duvidas sobre a modificação delle, repetia-se 2 a 3 vezes por dia. No quadro figura o que houve de mais caracteristico.

No par R 2, foi retirado o utero totalmente, da rata não castrada, para diminuir a massa de tecidos fixadores do hormonio ovariano, o que seria talvez um impecilho para a passagem desse á companheira castrada. A experiencia demonstrou, entretanto, que tal operação não era necessaria, e os resultados são nitidos (v. quadro).

No par R 2, já no 3º dia após a parabiose, a hysterectomisada estava em estro; mas um estro de intensidade supra normal, a julgar pela massa de cellulas keratinisadas, que enchiam totalmente a vagina como uma rolha, estadio representado no quadro: +++++. Tal aspecto nunca foi por nós observado em animaes normaes isolados. Esse estro durou 6 dias, quando normalmente elle dura, em media, de 1 a 2 dias.

Terminado esse primeiro estro, a parceira castrada apresentou-se tambem em estro, que durou 2 dias, sendo que no 1º elle tinha o aspecto acima descripto, de enorme abundancia de cellulas keratinisadas.

Seguiu-se a isso um periodo de diestro; no 17º dia, a hysterec. estava em proestro; 48 horas após, a mesma cousa for observada na castrada.

Do 22º ao 29º dia, nova phase de estro prolongado, durando cerca de 8 dias, nos dois animaes.

Do 34º ao 42º, um terceiro cyclo prolongado; mas nesse, ha a notar uma modificação do quadro, que se torna irregular na não castrada. Enquanto que na castrada o estadio de keratinisação pura é verificado durante pelo menos 8 dias, a não castrada apresentava sempre cellulas nucleadas ou leucocytos, de mistura com as keratinisadas.

No par R 3 (normal mais castrada) os resultados são perfeitamente identicos, e, em suas linhas geraes, concordam plenamente com o descripto em R 2; basta acompanhar o quadro para verificar isso. Tambem ahi, na terceira grande serie de estro, na castrada foi possivel encontrar o estadio de pura keratinisação, ao passo que na normal leucocytos ou cellulas nucleadas estavam sempre presentes.

Os animaes sempre se mantiveram em optimas condições geraes e harmonicamente, isto é, sem que um delles fosse anemico ou plethorico.

No 38º dia, o par R 3 foi submettido á laparotomia, retirando-se então os ovarios e pontas uterinas dos 2 animaes; em seguida fechou-se de novo a cavidade abdominal, e os ratos conservados vivos.

Nessa occasião, observou-se que a união dos tecidos era perfeita; vasos perfeitamente visiveis a olho nú iam de um animal para outro, estabelecendo uma communicação vascular ampla. Na mesma occasião fez-se operação identica no controle normal.

Nos dias subsequentes, observou-se, em relação ao cyclo estral, o seguinte: *Par R 3*—dois dias de estro na castrada; um dia de cellulas nucleadas puras, na parceira anteriormente normal. *Controle*—Um cyclo estral normal. Em seguida, repouso sexual em todas.

Os orgãos retirados (figura 2) mostram o grande augmento dos ovarios da parabiosada, e tambem do utero, em relação ao controle normal, congestos; o utero da castrada, si não tem um desenvolvimente comparavel ao controle, está entretanto longe do aspecto atrophico e anemico que

se observa após a castração. A morte do controle castrado impede uma comparação; todavia, como o rato é hoje um animal standardisado para esta sorte de pesquizas, qualquer especialista verificará ao examinar a figura, que tal orgão soffreu evidentemente a influencia do hormonio ovariano da companheira.

Microscopicamente, os ovarios de R 2 demonstram uma luteinisação abundante, e os poucos folliculas encontrados apresentam-se muito dilatados, como cystos em inicio.

O estudo detalhado da histologia da genitalia dos parabiosados constituirá assumpto para publicação posterior.

DISCUSSÃO

Acreditamos que as experiencias citadas demonstram seguramente a circulação do hormonio no animal castrado, quando unido em parabiose com um não castrado.

Alem daquellas, outras repetidas em camondongos confirmam os resultados.

Os ovarios do animal em parabiose trabalham portanto em excesso, havendo hormonio em quantidade sufficiente para a provocação de um estro prologado nos dois animaes. Isso é devido á acção dos hormonios do lobo anterior da hypophyse, que passam do castrado para o normal.

Em nosso artigo anterior, já discutimos o assumpto, lembrando que MATSUYAMA (4) foi o primeiro a descrever as alterações da genitalia das ratas normaes, quando unidas a castradas. O que no momento não tinha explicação razoavel, hoje, se interpreta pela acção dos hormonios prehypophysiarios. KALLAS (5), especialmente, provocando a puberdade precoce em ratos infantis normaes, ligados a infantis castrados, tornou evidente a acção caracteristica do lobo anterior da hypophyse.

Ha portanto, em circulação no animal castrado, hormonios do lobo anterior (H. KALLAS, FELS, TH. MARTINS).

Na parabiose com colioanastomose, as trocas humoraes se fazem muito precocemente; não é de extranhar portanto, que já no 3º ou 4º dia o hormonio prehypophysario vá influir sobre os ovarios da normal.

Analysando mais aprofundadamente a questão, varias interpretações poderiam ser suggeridas. Uma se apresentaria logo, e impunha-se eliminal-a. Como é sabido, ZONDEK e ASCHHEIM (6) demonstraram a grande producção de hormonio hypophysiario durante a gravidez, na mulher e no chimpanzé.

Na parabiose de um animal castrado com um normal, temos uma situação muito semelhante á gravidez em inicio, que até certo ponto é uma parabiose de um organismo sexuado com um neutro.

Apezar de não se ter ainda demonstrado tal superproducção hormonal nos roedores, durante a prenhez, era necessario verificar si na parabiose o hormonio provem do castrado, ou si ao contrario é secretado em excesso pelo normal. Com a injecção de sangue de ratos infantis castrados em infantis normaes, demonstramos anteriormente (1) que se pode provocar a puberdade precoce.

O hormonio, portanto, circula livremente no castrado.

Poder-se-ia admittir um accumulo da secreção normal, na ausencia dos orgãos fixadores do hormonio, como acredita FELS. Em nosso trabalho anterior, apresentamos a interpretação de que existe uma interrelação reciproca, entre gonadas e hypophyse. Com a castração, no animal infantil, ha uma actividade prematura da hypophyse; e no auimal adulto, uma hyperfuncção.

Num trabalho de LIPSCHÜTZ (7) sobre a folliculina, que chegou ás nossas mãos ha dias, é dito de passagem que experiencias de KALLAS, no laboratorio daquelle eminente professor, "revelaron con gran probabilidad el hecho importantisimo que ya antes de la pubertad el ovario influye sobre el lobulo anterior de la hipofisis".

A nossa interpretação se approxima portanto, da de KALLAS, a julgar pelo curto trecho citado.

As experiencias que temos tentado, e que viriam decidir a questão de accumulo ou hyperfuncção, tem encontrado grandes difficuldades quanto á resistencia dos animaes. Nós nos propuzemos a fazer a parabiose de castrados com normaes, tirando a hypophyse de um ou de ambos; mas a ablação desse orgão já por si é das menos supportadas; combinada á parabiose, difficilmente é compativel com a vida. Os nossos operados (cães) não tem resistido, mas continuamos as tentativas.

* * *

Voltando á questão do estro nos dois pares de parabiose descriptas neste trabalho, poremos em evidencia alguns pontos interessantes.

O que impressiona, na observação de 46 dias, é a perfeita coincidencia dos resultados. Tomando em consideração as não castradas dos pares R 2 e R 3, verifica-se que houve, de inicio, um estro prolongado; depois, um espaço de 14 dias, um cyclo curto, que não chegou a estro completo. Em seguida, nova phase de estro alongado; depois disso, um lapso de quadros irregulares, em que leucocytos e cellulas nucleadas estão sempre presentes; mas, tanto em R 2 como em R 3, a castrada demonstrava nessa occasião estro completo. Depois de retiradas as partes uterinas e os ovarios do par R 3, ainda houve dois dias de estro na castrada, e um de cellulas nucleadas puras na parceira, o que significa acção do hormonio ovariano ainda restante na circulação ou já fixado pelos effectuadores. Da mesma maneira, no controle normal, a castração feita no segundo dia de diestro, não impediu o cyclo seguinte.

ZONDEK e ASCHHEIM referem a impossibilidade de obter estro duradouro, pela administração chronica de hormonio hypophysario; no decurso de 14 dias, elle se apresenta uma ou duas vezes. Examinando o quadro, verifica-se que realmente, o resultado corresponde á descripção de ZONDEK e ASCHHEIM, nos primeiros 17 dias. Dahi em diante, elle se caracteriza por mais dois periodos estraes longos. Tem-se a impressão de de um periodismo, que poderá ser devido á hypophyse, ou aos ovarios.

Quanto á irregularidade dos elementos do frottis vaginal encontrada nas não castradas R 2 e R 3 no 3º longo periodo, não temos ainda explicação satisfactoria. Cyclos estraes curtos, dos quaes não foi possivel surprehender o estado de keratinisação pura? A keratinisação mantida pelas

castradas, nesse periodo, torna obscura a interpretação. Existencia de um factor na normal, que não influia sobre o estro da castrada?

Talvez a irritação devida á retirada do material para frottis, durante praso tão longo, provoque alterações da mucosa; mas nesse caso, o mesmo facto deveria ser observado nas castradas ou no controle normal livre.

E' uma questão a elucidar. (*)

BIBLIOGRAPHIA

Ver no final da traducção ingleza.

(*) Nota durante a impressão — Recebemos, enviado amavelmente pelo Prof. LIPSCHÜTZ, separatum de uma conferencia de H. KALLAS, em Concepcion, Chile (Bol. de la Soc. de Biol. de Concepcion, 3, 3, 4—1929). Neste trabalho se allude á possivel exacerbação do lobo anterior, após a castração; desse modo, o nosso ponto de vista concorda com o de KALLAS, vendo nos resultados das experiencias de parabiose uma demonstração da reciprocidade de correlações entre gonadas e hypophyse.

The estrous cycle of the albino rat in parabiosis, and the hormons of the anterior hypophysis

By THALES MARTINS, M. D.

From the Laboratory of Physiology, Oswaldo Cruz Institute.

In the last issue of this Supplemento (1), we published our first observations on the parabiosis of the Albino Rat, as regards hormoneal interchange.

We demonstrated the passage of ovarian hormons from a normal to a spayed female. The same result was obtained, when the non castrated fellow was hysterectomized.

In this paper, a more extensive observation of the estrous cycle is described.

We have read publications of other authors, who investigated about te sex cycle of rats in parabiosis, with different results.

ZACHERL (2) in the parabiosis of a normal female with a castrated one, observed that, eight to ten days after the operation, the cyclic variations of the estrus disappeared and the vaginal smearing showed always leucocytes and epithelial cells. A stage of pure keratinized cells was never found; in the castrated fellow, the case was the same.

FELS (3) verified that the normal fellow would at times appear with prolongated estrus, but the castrated was continually in diestrus. To conclude, ZACHERL and FELS did not verify the passage of ovarian hormon from the normal rat to the castrated.

It is difficult to ascertain the exact cause for the difference of results in the quoted experiments and our own, because the papers are very summarized. Perhaps, insufficiency of vascular relations, or unsatisfactory health condition of the animal.

FELS succeeded in getting survivance for about three weeks after the operation, with a maximum of 38 days.

We have animals in very suitable conditions, now with seventy days of parabiotic life; and the pair R 3 (fig. 1) was photographed on the 46th day.

EXPERIMENTS

Six female albino rats of the same litter were taken for this series. When they reached a weight of 35 to 37 grams three of them were castrated. Twenty five days later, when weighing 75 to 80 grams, the parabiosis were performed by coelioanastomosis, the abdominal cavities widely opened; the sutures were effected in three stages: peritoneum, muscle and skin.

The animals were distributed as follows:

Pair R 2—One hysterectomized with one castrated;
Pair R 3—One normal with one castrated;
Solitary controls—One normal and one castrated.

The vaginal smearing was tested daily with the usual technique; when any doubt could exist about possible alteration, it was repeated two or three times daily. In the table, we see the more characteristical findings. In the pair R 2, the uterus of the non castrated fellow was totally ablated, in order to diminish the mass of fixing tissues for ovarian hormon.

The experiment demonstrated, however, that such an operation was not necessary, and the results are conclusive (See Table).

In pair R 2, already on the third day after the parabiosis, the hysterectomized was in full estrus; but in a supra normal estrus, such as we never observed in normal animals. The vagina was overfilled with the keratinized cells mass, quite as plugged. This stage is shown in the table: ++++.

This first estrus lasted for six days, (when, normally its duration in our rats, is, as an average, 1 to two days) after which the castrated fellow showed a two days estrus; on the first day, with the above referred aspect with a huge plenty of keratinized cells. This was followed by a period of diestrus. On the seventeenth day, the hysterectomized was in pro-estrus; 48 hours later, the same was observed in the castrated.

From the twenty-second to the twenty-ninth day, new stage of prolonged estrus, with a duration of about eight days in both animals.

From the thirty-fourth to the forty-second, one third estrous period, in which, however, a modification of the smearing aspect must be emphasized.

Wilst in the castrated fellow, the stage of pure keratinization was to be observed for at least eight days, the non castrated always showed nucleated cells and leucocytes mixed with the keratinized.

In Pair R 3 (normal plus castrated), the results are similar. In general lines, they are plainly concordant with R 2. The mere comparizon of both tables is a proof thereof. In the third prolonged stage of estrus in the castrated, it was possible to detect the pure keratinization stage, but in the normal, leucocytes and nucleated cells were always present.

The animals were always kept in the best possible general conditions. The parabiosis was harmonical, that is to say, none of them was either anemie or plethoric.

On the thirty-eighth day, the pair R 3 was laparatomized; the ovaries and uterine cornua were ablated, the abdominal cavities were sutured and the animals kept alive.

By this opportunity, it was observed that the union of the tissues was perfect; blood vessels, plainly seen with the naked eye, in the abdominal wall, went from one to the other animal, thus establishing an ample vascular connection.

At the same time, an identical operation was effected with the normal control.

On the following days, it was observed, as regards estrus cycle, in pair R 3, two days of days of estrus in the castrated, one day of pure nucleated cells, in the previously normal follow.

Control.—A normal estrus cycle, followed by a period of rest.

The ablated organs (fig. 2) showed in the normal fellow an increase of the ovaries and uterus, richly vascularized. The uterus of the castrated fellow, if not so developed than the control's is however far from the atrophic and anemic appearance observed after castration. The death of the castrated solitary control prevented us from making a comparizon; nevertheless, being the rat nowadays a standardized animal for this kind of researches, any specialist may verify, on examining the figure, that this organ was probably influenced by the ovarian hormon from the normal fellow.

Microscopically, the ovaries of R 2, showed a full luteinization; the few follicles found were much distended, like incipient cysts.

Careful histologic study of the whole genitalia will be the object of an extensive description to be published later.

DISCUSSION

We believe the experiments we have reported, demonstrate with certainty a circulation of the ovarian hormon taking place in the castrated animal, when united in parabiosis with a non castrated.

Besides this, we have in course experiments in mice, confirming these results.

The ovaries of the animal in parabiosis secrete thus exaggeratedly; the hormon existing in quantity, sufficient to produce prolonged estrus in two animals. This must be ascribed to the action of the anterior hypophysis hormons, that pass from the castrated to the normal animal.

In our previous paper, we discussed this question, and remembered that MATSUYMA (4) was the first author, who described the changes of the genital organs, in a normal rat, when this was united with a castrated one. What till now remained without a satisfactory explanation is to-day interpreted as owing to the action of the prehypophyseal hormons.

More particularly, KALLAS (5) inducing precocious maturity in infantile normal rats, when parabiosed with infantile castrated, made patent the characteristical action of the hypophyseal anterior lobe.

These hormons circulate in the castrated animal (H. KALLAS, FELS, TH. MARTINS).

In the parabiosis with coelioanastomosis, the humoral interchanges are very precocious. No wonder then, if already on the third or fourth day, the pituitary hormons act upon the fellow.

By going more thoroughly into the question, various explanations could be suggested. One would appear at first and could be easily tested. It is known that ZONDEK and ASCHHEIM (6) have demonstrated the the enormous production of hypophyseal hormons during pregnancy in women and chimpanzee.

In the parabiosis of a castrated with a normal animal, we have an experimental condition, similar to beginning pregnancy, which, to a certain extent, is also a parabiosis of a female organism with a sexually neutral one.

Though we did not up to the present, succeed in demonstrating the elimination of hypophyseal hormones by pregnancy in rodents, it was necessary to ascertain, whether in parabiosis, the hormon is elaborated by the castrated fellow, or if, on the contrary, it is secreted in excess by the normal.

By injecting blood from infantile castrated in infantile normal rats, we demonstrated in a former work (1) that precocious maturity can be induced; this proves that the hormon circulates in the blood from spayed animals. One might admit that this means merely accumulation of the normal secretion in the absence of the receptor organs (ovaries) as FELS supposes.

Our interpretation, as we suggested, is that there exists a reciprocal interrelation between gonads and hypophysis.

After castration in infantile animals, there is precocious activity, and if the castration is effected in adult animals, an hyperfunction establishes itself.

In a paper of LIPSCHÜTZ (7) on Folliculin, which came to our hands a few days ago, it is stated occasionnally that KALLAS' experiments, at his laboratory, "revealed with a great probability, this most important fact that ovaries, already before puberty, exert an influence on the anterior lobe of the hypophysis". Our opinion is very near to KALLAS' as far as we may judge from the short passage quoted in that paper.

Decisive experiments should be the parabiosis of hypophysectomized (one or both) animals.

We have performed several attempts, however without success.

Hypophysectomy is a very severe operation, specially when in combination with parabiosis.

Our operated animals (dogs) did not survive for a time sufficient for observation, but we are proceeding further in our attemps.

* * *

Returning again to the question of estrus in both pairs of of parabiosis as described, there are some points which require to be emphasized. The most impressive fact is perhaps, after 46 days observation, the coincidence of results.

Taking in consideration the non castrated fellows (Pair R 2 an R 3), one may verify that there was, at the beginning, a prolonged estrus, after which, in a lapse of 14 days, a very short uncomplete cycle. Hereafter, a new stage of durable estrus; then, a series of irregular appearances, in which leucocytes and nucleated cells are always present. Nevertheless, as well in R 2 as in R 3, the castrated showed by this time a full estrus. After ablation of uterine cornua and ovaries from the pair R 3, there was still a two days' estrus in the castrated, and one of nucleated cells in the other fellow. This means an action of the ovarian hormons still existing in circulation, or already fixed by the effector organs. Likewise, in the normal free control, castration, performed on the second day of diestrus, did not prevent anyhow the following cycle.

* * *

ZONDEK and ASCHHEIM refer to the impossibility to induce durable estrus through chronic administration of hypophyseal hormons. In the course of 14 days, it appears once or twice. On examining the frame, one may verify that, as a matter of fact, the result is perfectly concordant with ZONDEK and ASCHHEIM's description, during the first 17 days; after this time, we observe two more prolonged periods of estrus. One gets the impression of a periodism, which may be ascribed to hypophysis or ovaries.

As regards the irregularity of the vaginal smearing constituents. which are found during the third long period, we are unable, up to the present, to give a satisfactory explanation of this fact. Should this mean short estral cycles, of which it has not been possible to detect the pure keratinization stage? The keratinization, maintained by the castrated leaves this interpretation obscure.

Does this imply the existence of a factor in the normal, which is of no influence on the estral condition in the castrated? May be, the irritation caused by the smearing test, during such a long time, determines alterations in the mucosa; but, in this case, the same ought to be observed in the castrated fellow or in the free normal control.

This is a question which only further study may solve (*).

BIBLIOGRAPHY

1—MARTINS, TH.—Instituto Oswaldo Cruz, Supplemento, nº. 10, pg. 233 and 242, 1929.
C. rend. Soc. Biol. (Soc. bres. de biologie, seance 28-8-929).
2—ZACHERL, H.—Klin. Woch., 6, 1614, 1927.
3—FELS—Med. Klin., 25, 557, 1929.
4—MATSUYAMA—Frankf. Zeits. f. Path., 25, 436, 1921.
5—KALLAS, H.—C. R. Soc. Biol., 100, 979, 1929.
6—ZONDEK and ASCHHEIM—Klin. Woch., 7, 831, 1928.
7—LIPSCHÜTZ, A.—Rev. Med. de Chile, 57, 503, 1929.

(*) NOTE.—In the course of printing, we received by kind attention of Prof. LIPSCHÜTZ, a separate paper from a lecture by H. KALLAS, in Concepción (Chile) (Bol. de la Soc. de Biol. de Concepción, 3, 3, 4—1929). In this paper, the author alludes to the possible exacerbation of the anterior lobe after castration; thus, our point of view would be in accord with KALLAS', when he sees, in the results of his parabiosis experiments, a demonstration of reciprocal a gonado-hypophyseal correlation.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

Days after parabiosis	R 2 Castrated				R 2 Hysterectomised				R 3 Castrated				R 3 Normal				
	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	Leucocytes	Mucus	Nucleated cells	*Keratinised cells*	
3					−	−	−	++++	+++	++	−	−	+	++	+++	−	
4	+++	++	−	−	−	−	−	++++	+++	++	−	−	−	−	−	+++	
5	+++	+++	−	−	−	−	−	+++	+	+++	−	−	−	−	−	+++	
6	+++	+++	+	−	−	+	−	+++	−	−	+++	+++	−	−	−	++++	
7	+	+++	+	−	−	−	−	++++	−	−	−	++++	++	−	+	++	
8	No material				+	−	+	+++	+++	+	++	−	+++	+	+	+	
9	−	−	−	++++	+++	+	++	+	+++	++	−	−	+++	+++	++	−	
10	−	−	−	++++	+++	+	+	−	+	++	−	−	+++	+++	−	−	
11	+	++	++	−	+++	++	+	−	+	++	++	−	+++	+++	−	−	
12	−	+	−	−	+++	++	+	−	+	++	−	−	++	+	+++	++	
13	+	++	+	−	+++	++	+	−	+++	+++	+	−	+	−	+++	+++	
14	+	++	+	−	+++	+++	+	−	+	+	−	−	+	+	++	−	
15	+	++	+	−	+++	++	−	+	+++	++	+	−	+++	++	+	−	
16	+	++	+	−	+	+	+++	−	−	++	−	−	−	+	−	−	
17	+	++	+	−	−	−	+++	++	−	+	−	−	+	+	+	−	
18	++	++	++	−	++	++	++	−	+	+	+	−	+	+	++	−	
19	−	−	+++	++	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	++	-	
20	+++	++	++	+	+	+	++	−	+	−	+++	+	++	++	++	−	
21	++	++	++	−	++	+	++	−	−	−	+	+++	−	++	+++	−	
22	−	−	++	−	−	+	+++	++	−	−	++	+	++	+	++	+	
23	−	−	−	++	−	++	++	+++	++	+	++	+	−	−	+++	++	
24	−	−	−	+++	−	−	−	+++	++	+	++	+	−	−	+	+++	
25	−	−	−	+++	−	−	−	+++	++	+	++	++	−	−	−	+++	
26	−	−	−	+++	−	−	−	+++	−	−	+++	++	−	−	−	+++	
27	−	−	−	+++	−	−	−	+++	−	−	−	+++	−	−	−	+++	
28	−	−	−	+++	−	−	−	+++	−	−	−	+++	−	−	−	+++	
29	−	−	−	+++	−	−	−	+++	No examination								
30	No examination								++	+	++	+	−	+	++	+	
31	+	+	++	+	++	−	+++	++	−	+	+	−	+	−	+	−	
32	++	++	++	−	++	+	++	−	++	++	++	−	+	++	++	−	
33	No material				++	++	++	−	+	+	+	−	+	−	+++	−	
34	−	−	++	+	+++	+	++	−	+	+	++	−	−	−	+++	−	
35	−	−	−	+	+	+	+++	−	−	−	−	++	−	−	+++	−	
36	−	−	−	+++	+++	+	++	++	−	−	−	+++	−	−	−	+++	
37	−	−	−	+++	+++	+	++	+	−	−	−	+++	++	+	+++	+	
38	−	−	−	+++	+++	+	+++	++	−	−	−	+++	+	−	++	−	Laparatomy
39	−	−	−	++	+++	+	++	++	−	−	−	+++	−	−	+++	−	
40	−	−	−	+++	−	−	+++	−	−	−	−	+++	+++	+	++	+	
41	−	−	−	+++	++	+	++	+	+++	++	++	+	+++	++	++	++	
42	−	−	−	+++	+++	++	++	+	++	+	+	−	+++	+	+	+	
43	++	+	++	++	+++	+	++	+	++	+	++	−	+++	+++	+	−	
44	++	++	++	−	+	+	++	+	++	++	++	−	++	++	++	−	
45	+	+	+	−	++	++	++	-	+++	+	+	−	+++	+	+	-	
46	+	+	−	-	+++	+	++	--									

Fig. 1 Photo J. Pinto

Par R 3, no 46o dia de vida parabiotica.
Pair R 3, 46th. day of parabiotic life.

Fig. 2 Photo J. Pinto

1—Pontas uterinas da rata castrada (Par R 3).
2—Ovarios e pontas uterinas da rata normal (Par R 3).
3—Ovario e pontas uterinas do controle normal.

1—Uterine cornua (castrated R 3).
2—Ovaries and uterine cornua (normal R 3).
3—Ovaries and uterine cornua (solitary normal control).